

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

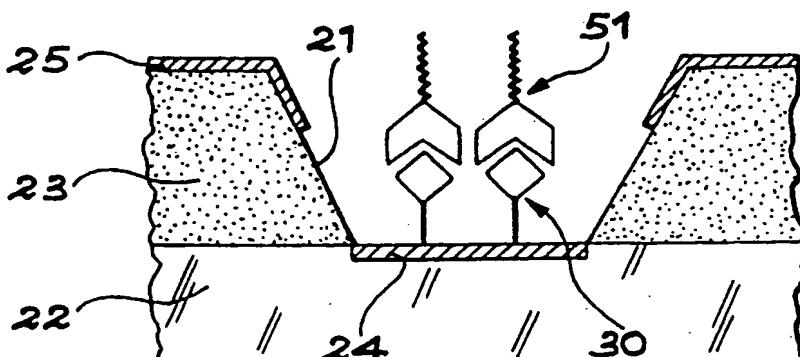
(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>G01N 27/327, 33/543, C12Q 1/00</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/22425</b>
			(43) Date de publication internationale: <b>20 avril 2000 (20.04.00)</b>
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR99/02446</b> (22) Date de dépôt international: <b>12 octobre 1999 (12.10.99)</b>		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: <b>98/12800 13 octobre 1998 (13.10.98) FR</b>			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): COMMIS- SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): CLERC, Jean-Frédéric [FR/FR]; 8, rue du Mont Pertuis, F-38120 Le Fontanil (FR). CAILLAT, Patrice [FR/FR]; 10, rue de Provence, F-38130 Echirolles (FR). BIDAN, Gérard [FR/FR]; 3 rue des Trois Epis, F-38100 Grenoble (FR). CUZIN, Marc [FR/FR]; Lot Pelletière, F-38700 Corenc (FR).			
(74) Mandataire: LEHU, Jean; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: MULTI-ARRAY MICROSYSTEM FOR CHEMICAL OR BIOLOGICAL ANALYSIS

(54) Titre: MICRO-SYSTEME A MULTIPLES POINTS D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE

## (57) Abstract

The invention concerns a method for producing a multi-array microsystem for chemical or biological analysis comprising the following steps which consist in: designing a structure provided with microwells (21), each microwell being designed to receive a reagent and provided with fixing means (24) for maintaining said reagent; placing a first organic compound (30) on the fixing means (24) of the microwells, the first organic compound comprising a binding function with the second organic compound (51) and a binding function with the fixing means (24); placing, in each microwell (21), the second organic compound (51), the second organic compound having a corresponding binding function of the first organic compound (30) and comprising said reagent, to obtain in each microwell chemical or biological probes formed by the reagent bound to the fixing means (24) by the mutual coupling of the binding functions of the first (30) and second (51) organic compounds.



## (57) Abrégé

L'invention concerne la réalisation d'un micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique. La réalisation comprend les étapes consistant à: concevoir une structure pourvue de micro-cuvettes (21), chaque micro-cuvette étant destinée à recevoir un réactif et étant pourvue de moyens de fixation (24) permettant d'y rattacher ledit réactif; placer un premier composé organique (30) sur les moyens de fixation (24) des micro-cuvettes, le premier composé organique comportant une fonction d'accrochage avec un deuxième composé organique (51) et une fonction d'accrochage avec les moyens de fixation (24); placer, dans chaque micro-cuvette (21), le deuxième composé organique (51), le deuxième composé organique comportant une fonction d'accrochage avec la fonction d'accrochage correspondant du premier composé organique (30) et comportant ledit réactif, pour obtenir dans chaque micro-cuvette des sondes d'analyse chimique ou biologique constituées par le réactif attaché aux moyens de fixation (24) par le couplage des fonctions d'accrochage des premier (30) et deuxième (51) composés organiques entre eux.

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yugoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## MICRO-SYSTEME A MULTIPLE POINTS D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE

5

### Domaine technique

La présente invention concerne un micro-système à multiple points d'analyse chimique ou 10 biologique mettant en oeuvre un couplage entre les sondes et un substrat.

La micro-électronique classique est de plus en plus appelée à être un maillon de systèmes beaucoup plus complexes dans lesquels plusieurs fonctions sont 15 intégrées. Ces systèmes ou micro-systèmes vont des applications capteurs physiques aux derniers développement de puces dites "biologiques".

Dans le premier cas, une cellule sensible 20 capable de mesurer un phénomène physique est associé à un circuit intégré capable d'assurer le traitement de l'information et son exploitation. C'est le cas des coussins pneumatiques de sécurité de l'industrie automobile (connus sous le nom de "air-bag" dans la terminologie anglo-saxonne).

Dans le deuxième cas, un circuit intégré 25 subit une finition lui permettant d'être utilisé dans un milieu biologique. C'est le cas par exemple d'un mesureur de glucose intégré ou des sondes de pression sanguine.

Dans tous les cas, l'interface entre le 30 milieu de la micro-électronique classique et celui des capteurs ou des biologistes est l'élément clef de ces micro-systèmes.

L'analyse chimique ou biologique est en 35 train de subir la révolution de la miniaturisation liée

à l'utilisation des microtechnologies. Lorsque des tests multiples peuvent être regroupés sur un support de quelques mm<sup>2</sup>, les coûts sont réduits et une analyse naguère exceptionnelle peut être utilisée de façon courante.

La demande vers des systèmes permettant l'analyse chimique ou biologique à très grand nombre de points est en émergence à l'heure actuelle avec l'apparition du screening en pharmacologie et des tests ADN en biologie.

Dans le premier cas, il faut déterminer sur un support comportant un grand nombre de cuvettes remplies du même réactif, l'effet de différentes molécules que l'on dépose sélectivement dans chaque cuvette de façon séquentielle. Dans le deuxième cas chaque cuvette est remplie d'une sonde ADN différente et l'analyte dont on veut connaître la séquence génomique est mis en contact au moment de l'analyse avec l'ensemble des cuvettes. En chimie analytique également la demande est forte vers la miniaturisation des cuvettes de réactions chimiques.

Tant d'un point de vue réalisation des cuvettes, dépôt des liquides dans ces cuvettes que système de lecture et d'acquisition des résultats, les efforts en Recherche et Développement sont importants.

#### **Etat de la technique antérieure**

Dans le domaine de l'analyse biologique ou plus généralement des tests en pharmacologie de nouvelles molécules, la réduction de la taille de l'outil de test est extrêmement séduisante d'un point de vue économique. Plus précisément, on peut assimiler un micro-système d'analyse à une structure associant un support sur lequel des réactifs différents sont tout

d'abord fixés puis mis en présence de la solution à analyser, et une méthode permettant de mesurer la réactivité obtenue. Eventuellement, un traitement dans le micro-système lui-même de l'information obtenue peut 5 être prévu.

Il existe différentes techniques pour fixer des réactifs différents sur un substrat.

Une première technique consiste à activer des sites où seront ensuite déposés et fixés les 10 réactifs par des molécules chimiques diverses. C'est une technique principalement employée sur des substrats en verre. Les réactifs sont déposés par micro-pipettage ou par une technique du type jet d'encre. Côté chimie, pour assurer l'interface entre le substrat et le 15 réactif, on peut citer les silanes, les lysines, les thioles lorsque le substrat est préalablement recouvert d'or. Cette chimie est complexe, surtout lorsqu'il s'agit de maîtriser sa reproductibilité sur un substrat pouvant comporter quelques milliers de sites 20 différents. On peut citer, comme représentatif de cette technique, le brevet US 5 474 796 qui se rapporte à la structuration de surface : les réactifs sont fixés sur un substrat présentant des zones hydrophiles et des zones hydrophobes. Le matriçage obtenu est de ce fait 25 très régulier.

Selon une deuxième technique appliquée au domaine des puces à ADN (le réactif est une sonde ADN, notamment un oligonucléotide d'une vingtaine de bases), il a été proposé de construire la sonde base après base 30 sur chaque site. Il est connu d'utiliser des masquages successifs pour faire cette synthèse *in situ* : chaque site est recouvert d'une base photoprotégée. Le photomasquage permet ensuite d'ôter la protection des sites et de venir accrocher chimiquement une base 35 supplémentaire photoprotégée. L'opération est répétée

jusqu'à l'obtention, sur chaque site, de la sonde voulue. Il est actuellement possible de construire plusieurs dizaines de milliers de sondes différentes sur un substrat. Cette technique est excellente mais 5 elle ne permet pas d'obtenir des sondes à grand nombre de bases (la limite est d'environ 20). Il est possible également de fixer au départ une base protégée non plus par un radical photosensible mais par un radical chimiquement sensible. Il faut alors, par pipettage ou 10 par une technique du type jet d'encre, venir localement sur les sites choisis pour ôter la protection de la base existante et y accrocher une base supplémentaire.

Une troisième technique concerne l'électrodéposition sur site polarisé électriquement 15 d'un polymère conducteur porteur de l'espèce réactive choisie. On peut se reporter à ce sujet à l'article "Electropolymerization of pyrrole and immobilization of glucose oxidase in a flow system : influence of the operating conditions on analytical performance" de 20 Juan-C. VIDAL et al., paru dans Biosensors & Bioelectronics, vol. 13, No 3-4, pages 371-382, 1998. Le substrat est relié électriquement vers l'extérieur et trempé dans une cuve contenant l'espèce chimique à déposer. Le site choisi est polarisé et la 25 copolymérisation s'effectue (en moins d'une minute sous une tension inférieure à 1 V). On passe à une autre solution porteuse d'un autre réactif, un autre site est polarisé à la surface du substrat et ainsi de suite. Par ce moyen, des réactifs différents ont été fixés sur 30 des zones différentes du substrat, permettant ainsi une analyse multipoint.

Une amélioration intéressante de cette dernière technique consiste à intégrer l'électronique d'adressage des sites dans le substrat lui-même. Les 35 polymères conducteurs utilisés pour ce procédé sont les

polyanilines, les polypyrroles. On peut se reporter à ce sujet aux documents WO 94/22 889, FR-A-2 741 475 et FR-A-2 741 476. Cette façon de faire est intéressante car la fixation de la sonde sur son site est forte, 5 reproductible et bien maîtrisée. C'est une technique séquentielle : chaque site est polarisé successivement et le substrat est recouvert totalement ou trempé dans la solution porteuse du réactif à chaque passe. Cependant, lorsque le nombre de sites devient 10 important, le temps de traitement de chaque support de sites devient prohibitif : autant de fois le temps de copolymérisation plus le temps de rinçage et d'introduction du nouvel électrolyte.

L'utilisation de ces dispositifs à sondes 15 biologiques peut faire appel à une palette très étendue de méthodes : mesure électrique par impédance-métrie, microbalance, mesure optique par changement d'indice de réfraction, marquage radioactif, fluorescence. Cette dernière méthode est de plus en plus utilisée car elle 20 est relativement facile à mettre en oeuvre et elle présente une bonne sensibilité. Schématiquement, elle consiste à coupler l'analyte à tester avec un fluophore. L'analyte est mis en contact avec le réactif fixé localement sur le micro-système. S'il y a 25 réaction/appariement de quelque nature que ce soit, il restera sur la zone de test l'analyte portant le fluophore. Après lavage, une lecture de la fluorescence permettra de déterminer s'il y a eu appariement sur le site porteur.

30

#### **Exposé de l'invention**

Pour remédier aux problèmes de l'art antérieur, la présente invention propose l'utilisation 35 d'une structure où chaque site est pourvu d'un composé

organique offrant une fonction biotine. Chaque site peut alors recevoir une sonde chimique ou biologique constituée par un réactif déterminé (un petit morceau d'un brin d'ADN par exemple) associé par exemple à une 5 fonction avidine ou streptavidine. Dans ce cas, le couplage qui se réalise entre les fonctions avidine et biotine assure la fixation des sondes sur leurs sites respectifs.

10 L'invention a donc pour objet un procédé de réalisation d'un micro-système à multiple points d'analyse chimique ou biologique, comprenant les étapes consistant à :

15 - concevoir une structure pourvue de micro-cuvettes, chaque micro-cuvette étant destinée à recevoir un réactif et étant pourvue de moyens de fixation permettant d'y rattacher ledit réactif,

20 - obtenir un premier composé organique comprenant une fonction d'accrochage avec lesdits moyens de fixation et une fonction d'accrochage avec un deuxième composé organique, ces deux fonctions d'accrochage étant séparées par un espaceur,

25 - obtenir un deuxième composé organique comprenant une fonction d'accrochage avec la fonction d'accrochage correspondante du premier composé organique et comprenant un réactif,

- fixer le premier composé organique sur les moyens de fixation des micro-cuvettes au moyen de sa fonction d'accrochage correspondante,

30 - placer, dans chaque micro-cuvette, un deuxième composé organique pour obtenir dans chaque micro-cuvette des sondes d'analyse chimique ou biologique constituées par le réactif attaché aux moyens de fixation par le couplage des fonctions d'accrochage correspondantes des premier et deuxième 35 composés organiques.

Selon une première variante, l'étape consistant à fixer le premier composé organique sur les moyens de fixation des micro-cuvettes s'effectue par 5 électro-polymérisation, les moyens de fixation étant des moyens conducteurs accessibles électriquement, la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation étant constituée par un monomère conducteur, une contre-électrode étant utilisée pour 10 effectuer l'électro-polymérisation. Les moyens conducteurs peuvent comprendre une électrode commune à toutes les micro-cuvettes. La structure peut être conçue à partir d'un substrat dont une face présente ladite électrode commune, une couche de matériau 15 isolant étant déposée sur ladite électrode commune, la couche de matériau isolant étant creusée jusqu'à ladite électrode commune pour former les micro-cuvettes dont le fond est constitué par l'électrode commune. La structure peut aussi être conçue à partir d'un substrat 20 actif présentant une pluralité d'électrodes sur l'une de ses faces, cette pluralité d'électrodes constituant les moyens de fixation, une couche de matériau isolant étant déposée sur ladite face, la couche de matériau isolant étant creusée jusqu'aux électrodes pour former 25 les micro-cuvettes, des moyens de multiplexage étant prévus pour relier électriquement la pluralité d'électrodes afin de réaliser l'électro-polymérisation. La contre-électrode peut être une électrode solidaire de la structure ou être placée en regard des moyens de 30 fixation lors de l'opération d'électro-polymérisation. Avantageusement, le monomère conducteur du premier composé organique est du pyrrole.

Selon une deuxième variante, l'étape consistant à fixer le premier composé organique sur les moyens de fixation des micro-cuvettes consiste à mettre 35

en oeuvre une liaison covalente entre la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation et les moyens de fixation. Cette liaison covalente est par exemple de type silanisation 5 (silane-biotine) ou un auto-assemblage mettant en oeuvre une liaison thiol-biotine.

Selon une troisième variante, l'étape consistant à fixer le premier composé organique sur les moyens de fixation des micro-cuvettes s'effectue par 10 voie chimique, par addition d'un réactif apte à provoquer la polymérisation sur les moyens de fixation du premier composé organique. Ce premier composé organique peut être du pyrrole et le réactif apte à provoquer la polymérisation d'un sel ferrique.

15 Selon un aspect particulièrement avantageux, la fonction d'accrochage du premier composé organique avec le deuxième composé organique est une fonction biotine, la fonction d'accrochage du deuxième composé organique avec le premier composé organique 20 étant une fonction avidine ou streptavidine. Le premier composé organique peut être un pyrrole biotinilé. Le deuxième composé organique peut être constitué dudit réactif directement rattaché à la fonction avidine ou streptavidine. Dans ce cas, l'étape consistant à 25 placer, dans chaque micro-cuvette, le deuxième composé organique peut comprendre le dépôt d'une solution contenant le deuxième composé organique dans chaque micro-cuvette puis l'élimination de cette solution pour ne garder que les sondes obtenues par accrochage 30 sélectif des premier et deuxième composés organiques, par exemple par liaison entre la biotine et la streptavidine/avidine.

Le deuxième composé organique peut aussi 35 être constitué dudit réactif rattaché à la fonction avidine ou streptavidine par l'intermédiaire d'une

fonction biotine. Dans ce cas, l'étape consistant à placer, dans chaque micro-cuvette, le deuxième composé organique peut comprendre le dépôt d'une première solution d'avidine ou de streptavidine dans chaque 5 micro-cuvette, puis l'élimination de cette première solution pour révéler le premier composé organique avec la fonction biotine complexée par ladite avidine ou ladite streptavidine, ensuite le dépôt d'une deuxième solution contenant ledit réactif sous forme biotinilée, 10 puis l'élimination de cette deuxième solution pour ne garder que les sondes obtenues.

L'invention a aussi pour objet un micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique constitué par une structure pourvue de 15 micro-cuvettes, chaque micro-cuvette étant destinée à recevoir un réactif et étant pourvue de moyens de fixation permettant d'y rattacher ledit réactif par l'intermédiaire d'un premier composé organique, le réactif faisant partie d'un deuxième composé organique, 20 le premier composé organique comportant une fonction d'accrochage avec le deuxième composé organique et une fonction d'accrochage avec les moyens de fixation, ces deux fonctions d'accrochage étant séparées par un espaceur, le deuxième composé organique comportant une 25 fonction d'accrochage avec la fonction d'accrochage correspondante du premier composé organique.

Selon une première variante, les moyens de fixation sont des électrodes et la fonction d'accrochage avec les moyens de fixation du premier 30 composé organique est un polymère conducteur. Les moyens de fixation peuvent former une électrode commune. Les micro-cuvettes peuvent être formées dans une couche isolante de ladite structure, les moyens de fixation formant le fond des micro-cuvettes. La 35 structure peut comporter une contre-électrode disposée

en opposition par rapport au fond des micro-cuvettes afin de pouvoir établir un champ électrique entre la contre-électrode et les moyens de fixation. Avantageusement, ledit polymère conducteur est un 5 polypyrrole.

Selon une deuxième variante, les moyens de fixation et la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation sont tels qu'ils forment une liaison covalente. Cette liaison covalente 10 est par exemple de type silanisation (silane-biotine) ou un auto-assemblage mettant en oeuvre une liaison thiol-biotine.

Selon une troisième variante, la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les 15 moyens de fixation comporte un réactif de polymérisation, par voie chimique, sur les moyens de fixation. Ce réactif peut être un sel ferrique.

Selon un aspect particulièrement avantageux, le premier composé organique comprend une 20 fonction biotine pour son accrochage avec une fonction avidine ou streptavidine du deuxième composé organique. Le premier composé organique peut être un polypyrrole biotinilé. Le deuxième composé organique peut être constitué dudit réactif directement rattaché à la 25 fonction avidine ou streptavidine. Le deuxième composé organique peut aussi être constitué dudit réactif rattaché à la fonction avidine ou streptavidine par l'intermédiaire d'une fonction biotine.

30 **Brève description des dessins.**

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donné à titre

d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- les figures 1A à 1E représentent différentes étapes de la réalisation d'une structure destinée à un micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique selon la présente invention ;

- la figure 2 illustre une étape d'électro-polymérisation effectuée dans les micro-cuvettes d'une structure destinée à un micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique selon la présente invention ;

- la figure 3 représente une micro-cuvette de la structure représentée à la figure 2 et au fond de laquelle est fixé un premier composé organique, selon le procédé de réalisation d'un micro-système conforme à l'invention ;

- la figure 4 représente une autre structure destinée à un micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique selon la présente invention,

- la figure 5 illustre une étape d'électropolymérisation effectuée dans les micro-cuvettes de la structure représentée à la figure 4 ;

- les figures 6 à 8 illustrent l'étape consistant à placer dans une micro-cuvette le deuxième composé organique pour obtenir une sonde d'analyse chimique ou biologique conforme à la présente invention ;

- la figure 9 illustre le procédé de fabrication d'un premier composé organique utilisable pour la présente invention.

Description détaillée de mode de réalisation de l'invention.

Les figures 1 à 8 illustrent la variante de réalisation pour laquelle les moyens de fixation du premier composé organique sont des électrodes et pour 5 laquelle le placement de ce premier composé organique se fait par électro-polymérisation, ces électrodes permettant l'application d'un potentiel électrique.

Pour cette variante de réalisation, deux cas sont à considérer. La structure peut comporter un 10 substrat passif, c'est-à-dire qu'il ne comporte pas d'électronique intégrée. Dans ce cas, le substrat peut être revêtu d'un plan conducteur (par exemple métallique) lui-même recouvert d'une couche d'un matériau assurant la fonction d'isolation électrique et 15 dans lequel sont formées les micro-cavités. Celles-ci débouchent localement sur le plan conducteur. Les zones découvertes du plan conducteur constituent alors les électrodes de réception.

Le substrat peut aussi être actif auquel 20 cas l'électronique qui lui est intégrée peut servir à différentes fonctions : chauffage localisé des sites, mesure locale de pH, lecture d'un signal de fluorescence, etc. Dans la plupart des cas, il n'est pas possible de laisser en court-circuit les sites pour 25 les fonctions ultérieures qui doivent rester adressables sur chaque site indépendamment des autres. Le multiplexage nécessaire à ces fonctions peut alors être utilisé au cours du procédé de réalisation du micro-système. Il est en effet possible d'adresser 30 collectivement tous les sites pour effectuer l'opération de fixation des réactifs. Chaque site pourra ultérieurement être adressé de façon individuelle.

Les figures 1A à 1E sont des vues en coupe 35 transversale et partielles. Elles illustrent un premier

mode de réalisation d'un micro-système selon l'invention pour lequel la contre-électrode est située en surface et pour lequel le substrat est passif.

La figure 1A représente un substrat 1 constitué par une plaquette qui peut être en un matériau tel que le verre, le silicium, le plastique. Sur une face principale de cette plaquette on a déposé une couche métallique 3, par exemple en chrome, en or ou en platine, d'une épaisseur comprise entre 0,1 et 10  $\mu\text{m}$ . Comme le montre la figure 1B, on dépose, sur la couche métallique 3, un film de polymère photosensible 5, par exemple un film de polyimide d'une épaisseur comprise entre 1 et 50  $\mu\text{m}$ .

Des micro-cuvettes 7 sont ensuite formées par insolation et développement du film de polyimide (voir la figure 1C). Elles sont avantageusement formées avec des flancs en pente. Les micro-cuvettes formées révèlent localement la couche métallique 3. Une nouvelle couche métallique 9 est alors uniformément déposée sur le film de polyimide y compris l'intérieur des micro-cuvettes 7. La couche métallique 9 peut être en chrome, en or ou en platine et avoir 0,1 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

Comme le montre la figure 1D, une couche de résine de masquage 11 est déposée sur la couche métallique 9 et des zones à graver dans cette couche métallique 9 sont définies.

La couche métallique 9 est alors gravée aux endroits accessibles et la résine 11 est retirée. On obtient la structure représentée à la figure 1E. Chaque micro-cuvette 7 présente en son fond une électrode 9a, toutes les électrodes 9a étant connectées électriquement grâce à la couche métallique 3. Une électrode commune 9b recouvre la face supérieure du film de polymère 5. Cette structure est prête pour

l'étape suivante consistant à placer le premier composé organique au fond des micro-cuvettes.

La figure 2 illustre l'étape d'électro-polymérisation. On a représenté une structure 20 pourvue de micro-cuvettes 21 et qui, contrairement au cas décrit précédemment, est constituée à partir d'un substrat actif 22. Les micro-cuvettes 21 ont été formées dans une couche isolante 23 déposée sur le substrat 22. Le fond des micro-cuvettes 21 est constitué par les électrodes 24 qui peuvent être, par multiplexage, reliées électriquement. Comme pour le cas décrit précédemment, une contre-électrode commune 25 a été déposée sur la partie supérieure de la couche isolante 23. Une différence de potentiel peut donc être appliquée entre la contre-électrode 25 et les électrodes 24 reliées électriquement par multiplexage.

Une couche 26 contenant des monomères appropriés, par exemple un mélange de pyrrole et de pyrrole biotinilé comme celui décrit plus loin, est déposée sur la face du substrat 20 présentant les micro-cuvettes. Une différence de potentiel appropriée est appliquée entre la contre-électrode 25 et les électrodes 24. Lorsque l'électro-polymérisation est achevée, les micro-cuvettes sont rincées et séchées. On obtient alors, comme le montre la figure 3, un composé organique 30, constitué de polypyrrrole biotinilé, fixé sur les électrodes 24. Ce composé organique adhère aux électrodes 24 par les cycles pyrroles et présente des molécules de biotine 31 rattachées à des cycles pyrroles par des espaces 32.

La structure destinée à constituer le micro-système selon l'invention peut ne pas comporter de contre-électrode directement déposée sur elle-même. Une telle structure est représentée à la figure 4. Dans ce cas, la structure 40 comprend par exemple un

substrat passif 41 dont une face est recouverte d'une couche métallique 42 formant électrode. Une couche isolante 43 a été déposée sur la couche métallique 42 et gravée pour former des micro-cuvettes 44.

5 L'électro-polymérisation est alors réalisée, comme représenté à la figure 5, dans une cuve 45 remplie d'une solution appropriée 46 contenant un mélange de monomères pyrrole et pyrrole biotinilé. Un générateur de tension continue 47 est branché entre 10 l'électrode 42 et une contre-électrode 48 disposée en vis-à-vis du fond des micro-cuvettes 44. L'électro-polymérisation provoque le dépôt de polypyrrrole biotinilé sur les zones apparentes de l'électrode 42 comme pour la figure 3. Les figures 6, 7 et 8 15 illustrent la fixation du deuxième composé organique. La cuve d'électro-polymérisation 45 peut comporter une électrode supplémentaire servant de référence.

L'étape suivante du procédé est représentée par la figure 6. Elle consiste à placer, dans chaque 20 micro-cuvette, une solution 50 comportant le deuxième composé organique 51. Ce deuxième composé organique comporte par exemple une fonction avidine ou streptavidine si le premier composé organique est biotinilé.

25 Une sonde ADN peut ainsi être constituée en choisissant comme deuxième composé organique de l'ADN streptavidiné qui est commercialisé. La reconnaissance biotine/streptavidine est très utilisée industriellement à cause du taux de reconnaissance 30 élevé, de l'insensibilité aux variations de température, d'un large choix du tampon, du pH, etc.

La figure 7 montre l'accrochage effectué entre la fonction biotine du composé organique 30 et la fonction avidine ou streptavidine du composé organique 35 51.

Après rinçage et séchage, on obtient un micro-système dont un point d'analyse est représenté à la figure 8. La micro-cuvette 21 est pourvue de sondes constituées par l'association des composés organiques 5 30 et 51.

Sur le polypyrrole biotinilé du fond des micro-cuvettes, on peut fixer des séquences d'ADN, d'ARN, des oligonucléotides, des enzymes, des acides nucléiques ou aminés, des protéines, des antigènes ou 10 tout produit pouvant être lié à l'avidine (ou la streptavidine) ou à la biotine. En effet, on peut former non seulement l'association : polypyrrole-biotine/(strept)avidine-réactif, mais aussi l'association : 15 polypyrrole-biotine/(strept)avidine/biotine-réactif.

On peut alors utiliser de l'ADN biotinilé qui est un produit commercialisé. La double reconnaissance biotine/streptavidine/biotine présente les mêmes qualités que la réaction de reconnaissance 20 biotine/streptavidine.

Il est à noter que l'invention permet le placement de manière collective du premier composé organique sur le fond des micro-cuvettes.

Le polypyrrole biotinilé qui s'accroche au 25 fond des micro-cuvettes est avantageusement un copolymère synthétisé à partir de pyrrole et de pyrrole biotinilé pour lequel la biotine est rattachée à l'atome d'azote d'un cycle pyrrole par un espaceur hydrophile. Le choix de cet espaceur peut être crucial. 30 Il doit être suffisamment long pour assurer une reconnaissance non restreinte de la biotine par l'avidine. Une longueur d'au moins onze atomes est particulièrement appropriée.

La figure 9 est un schéma représentant la 35 synthèse d'un pyrrole biotinilé. Cette synthèse est

obtenue par couplage d'un aminoalkylpyrrole et d'une entité biotine. La synthèse de l'aminoalkylpyrrole a été menée en utilisant une réaction telle que décrite par JIRKOWSKY et BAUDY dans *Synthesis*, 1981, page 481.

5 Les réactifs utilisés et les conditions des réactions sont les suivants :

i) 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (3 eq.), acide acétique/dioxanne à reflux, pendant 5 h, rendement 32% ;

10 ii) KOH 10% à reflux pendant 5 h, rendement 65% ;

iii) ester de d-biotine N-hydroxysuccinimide (1 eq.) dans le diméthylformamide à température ambiante pendant 16 h, rendement 54%.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de réalisation d'un micro-système à multiple points d'analyse chimique ou 5 biologique, comprenant les étapes consistant à :

- concevoir une structure (20, 40) pourvue de micro-cuvettes (21, 44), chaque micro-cuvette étant destinée à recevoir un réactif et étant pourvue de moyens de fixation permettant d'y rattacher ledit réactif,

- obtenir un premier composé organique (30) comprenant une fonction d'accrochage avec lesdits moyens de fixation et une fonction d'accrochage avec un deuxième composé organique, ces deux fonctions 15 d'accrochage étant séparées par un espaceur,

- obtenir un deuxième composé organique (51) comprenant une fonction d'accrochage avec la fonction d'accrochage correspondante du premier composé organique (30) et comprenant un réactif,

20 - fixer le premier composé organique (30) sur les moyens de fixation (24) des micro-cuvettes (21) au moyen de sa fonction d'accrochage correspondante,

25 - placer, dans chaque micro-cuvette (21), un deuxième composé organique (51) pour obtenir dans chaque micro-cuvette (21) des sondes d'analyse chimique ou biologique constituées par le réactif attaché aux moyens de fixation par le couplage des fonctions d'accrochage correspondantes des premier et deuxième composés organiques.

30 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape consistant à fixer le premier composé organique (30) sur les moyens de fixation (24) des micro-cuvettes (21) s'effectue par électro-polymérisation, les moyens de fixation étant 35 des moyens conducteurs accessibles électriquement, la

fonction d'accrochage du premier composé organique (30) avec les moyens de fixation étant constituée par un monomère conducteur, une contre-électrode (25) étant utilisée pour effectuer l'électro-polymérisation.

5 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les moyens conducteurs comprennent une électrode (42) commune à toutes les micro-cuvettes.

10 4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite structure (40) est conçue à partir d'un substrat (41) dont une face présente ladite électrode commune (42), une couche de matériau isolant (43) étant déposée sur ladite électrode commune, la couche de matériau isolant étant creusée 15 jusqu'à ladite électrode commune (42) pour former les micro-cuvettes (44) dont le fond est constitué par l'électrode commune.

20 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite structure (20) est conçue à partir d'un substrat actif (22) présentant une pluralité d'électrodes (24) sur l'une de ses faces, cette pluralité d'électrodes constituant les moyens de fixation, une couche de matériau isolant (23) étant déposée sur ladite face, la couche de matériau isolant 25 (23) étant creusée jusqu'aux électrodes (24) pour former les micro-cuvettes, des moyens de multiplexage étant prévus pour relier électriquement la pluralité d'électrodes (24) afin de réaliser l'électro-polymérisation.

30 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la contre-électrode (9b, 25) est une électrode solidaire de ladite structure.

35 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la contre-

électrode est une électrode (48) placée en regard des moyens de fixation lors de l'opération d'électro-polymérisation.

8. Procédé selon l'une quelconque des 5 revendications 2 à 7, caractérisé en ce que le monomère conducteur du premier composé organique (30) est du pyrrole.

9. Procédé selon la revendication 1, 10 caractérisé en ce que l'étape consistant à fixer le premier composé organique (30) sur les moyens de fixation (24) des micro-cuvettes (21) consiste à mettre en oeuvre une liaison covalente entre la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation et les moyens de fixation.

15 10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape consistant à fixer le premier composé organique sur les moyens de fixation des micro-cuvettes s'effectue par voie chimique, par addition d'un réactif apte à provoquer la 20 polymérisation sur les moyens de fixation du premier composé organique.

11. Procédé selon la revendication 10, 25 caractérisé en ce que le premier composé organique est du pyrrole et en ce que le réactif apte à provoquer la polymérisation est un sel ferrique.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la fonction d'accrochage du premier composé organique (30) avec le deuxième composé organique (51) est une 30 fonction biotine, la fonction d'accrochage du deuxième composé organique (51) avec le premier composé organique (30) étant une fonction avidine ou streptavidine.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le premier composé organique (30) est un pyrrole biotinilé.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que le deuxième composé organique (51) est constitué dudit réactif directement rattaché à la fonction avidine ou streptavidine.

10 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape consistant à placer, dans chaque micro-cuvette (21), le deuxième composé organique (51) comprend le dépôt d'une solution (50) contenant le deuxième composé organique (51) dans chaque micro-cuvette (21) puis l'élimination de cette solution pour ne garder que les sondes obtenues.

15 16. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que le deuxième composé organique (51) est constitué dudit réactif rattaché à la fonction avidine ou streptavidine par l'intermédiaire d'une fonction biotine.

20 17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'étape consistant à placer, dans chaque micro-cuvette (21), le deuxième composé organique (51) comprend le dépôt d'une première solution d'avidine ou de streptavidine dans chaque 25 micro-cuvette, puis l'élimination de cette première solution pour révéler le premier composé organique (30) avec la fonction biotine complexée par ladite avidine ou ladite streptavidine, ensuite le dépôt d'une deuxième solution contenant ledit réactif sous forme 30 biotinilée, puis l'élimination de cette deuxième solution pour ne garder que les sondes obtenues.

18. Micro-système à multiples points d'analyse chimique ou biologique constitué par une structure (20, 40) pourvue de micro-cuvettes (21, 44), 35 chaque micro-cuvette étant destinée à recevoir un

réactif et étant pourvue de moyens de fixation (24) permettant d'y rattacher ledit réactif par l'intermédiaire d'un premier composé organique (30), le réactif faisant partie d'un deuxième composé organique 5 (51), le premier composé organique (30) comportant une fonction d'accrochage avec le deuxième composé organique (51) et une fonction d'accrochage avec les moyens de fixation (24), ces deux fonctions d'accrochage étant séparées par un espaceur, le deuxième composé 10 organique (51) comportant une fonction d'accrochage avec la fonction d'accrochage correspondante du premier composé organique (30).

19. Micro-système selon la revendication 18, caractérisé en ce que les moyens de fixation sont 15 des électrodes (9a, 24) et en ce que la fonction d'accrochage avec les moyens de fixation du premier composé organique est un polymère conducteur.

20. Micro-système selon la revendication 19, caractérisé en ce que les moyens de fixation 20 forment une électrode commune (42).

21. Micro-système selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que les micro-cuvettes (21) sont formées dans une couche isolante (23) de ladite structure (20), les moyens de 25 fixation (24) formant le fond des micro-cuvettes.

22. Micro-système selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que ladite structure (20) comporte une contre-électrode (25) disposée en opposition par rapport au fond des 30 micro-cuvettes afin de pouvoir établir un champ électrique entre la contre-électrode et les moyens de fixation (24).

23. Micro-système selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que ledit 35 polymère conducteur est un polypyrrole.

24. Micro-système selon la revendication 18, caractérisé en ce que les moyens de fixation et la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation sont tels qu'ils forment une 5 liaison covalente.

25. Micro-système selon la revendication 18, caractérisé en ce que la fonction d'accrochage du premier composé organique avec les moyens de fixation comporte un réactif de polymérisation, par voie 10 chimique, sur les moyens de fixation.

26. Micro-système selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'édit réactif est un sel ferrique.

27. Micro-système selon l'une quelconque 15 des revendications 18 à 26, caractérisé en ce que le premier composé organique (30) comprend une fonction biotine pour son accrochage avec une fonction avidine ou streptavidine du deuxième composé organique (51).

28. Micro-système selon la revendication 20 27, caractérisé en ce que le premier composé organique (30) est un polypyrrrole biotinilé.

29. Micro-système selon l'une des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que le 25 deuxième composé organique (51) est constitué dudit réactif directement rattaché à la fonction avidine ou streptavidine.

30. Micro-système selon l'une des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que le 30 deuxième composé organique (51) est constitué dudit réactif rattaché à la fonction avidine ou streptavidine par l'intermédiaire d'une fonction biotine.

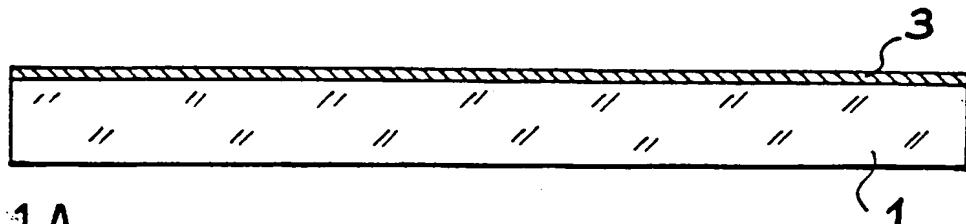


FIG. 1A

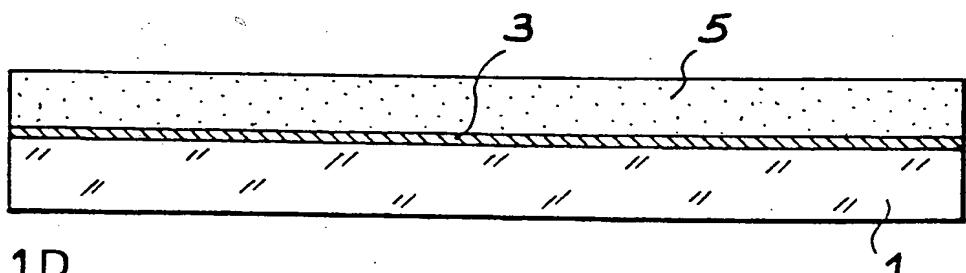


FIG. 1B

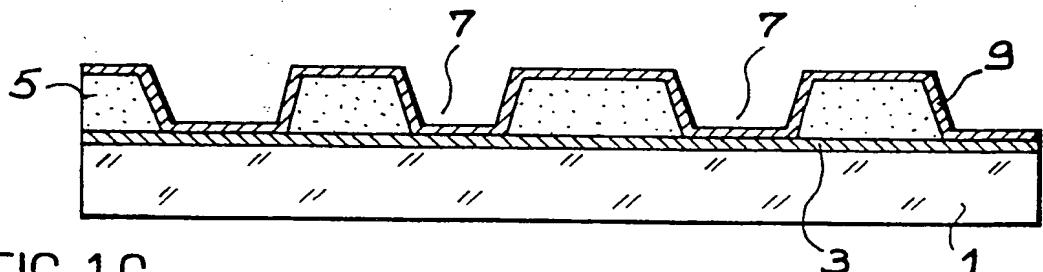


FIG. 1C

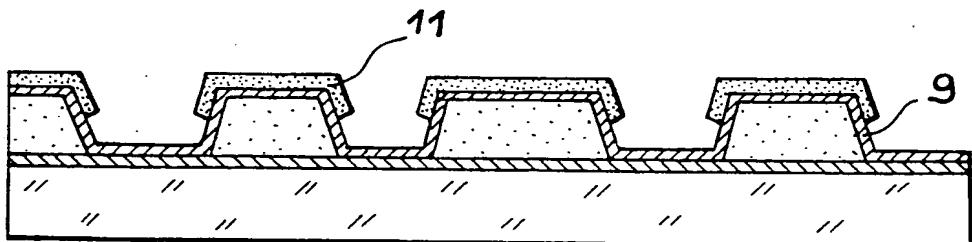


FIG. 1D

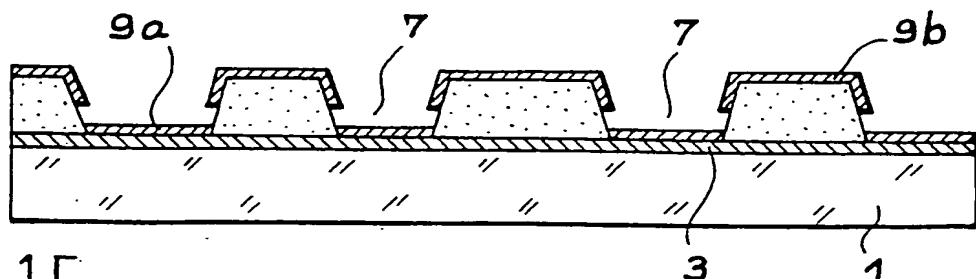


FIG. 1E

2 / 5

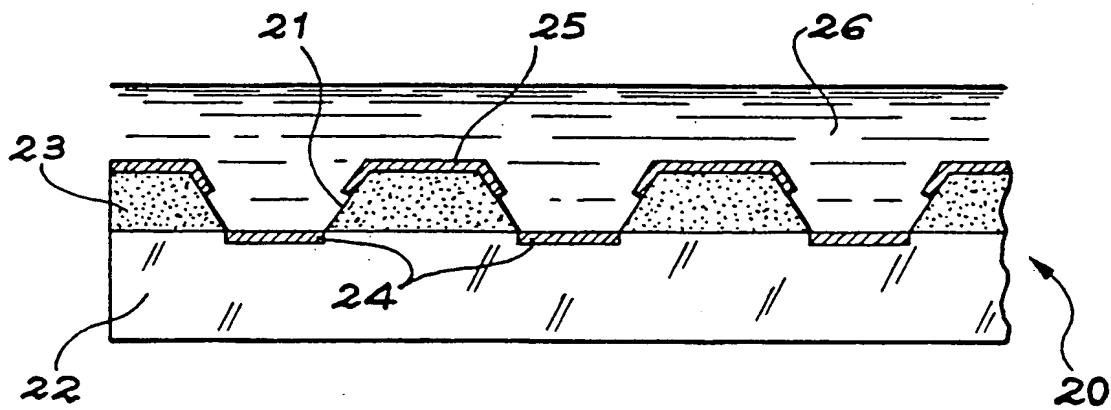


FIG. 2

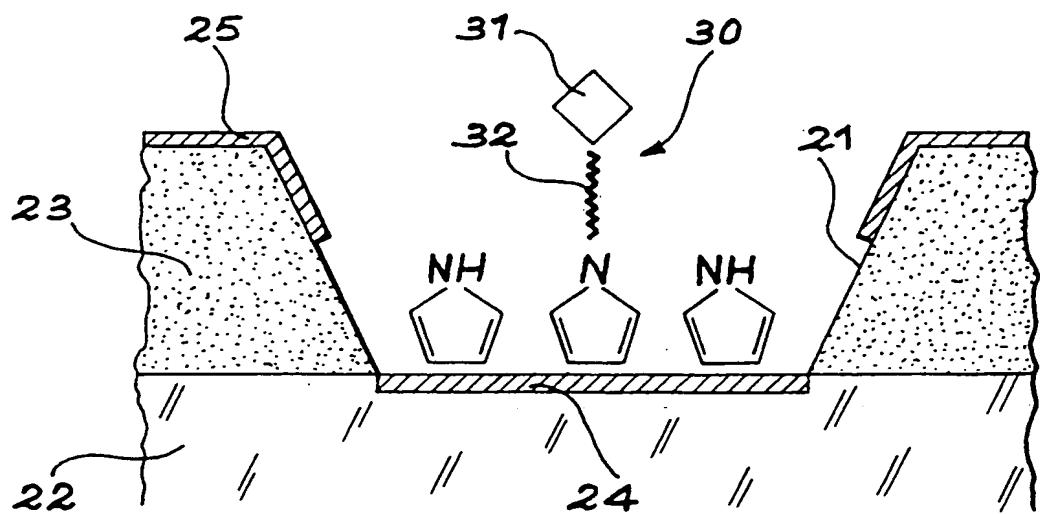


FIG. 3

3 / 5

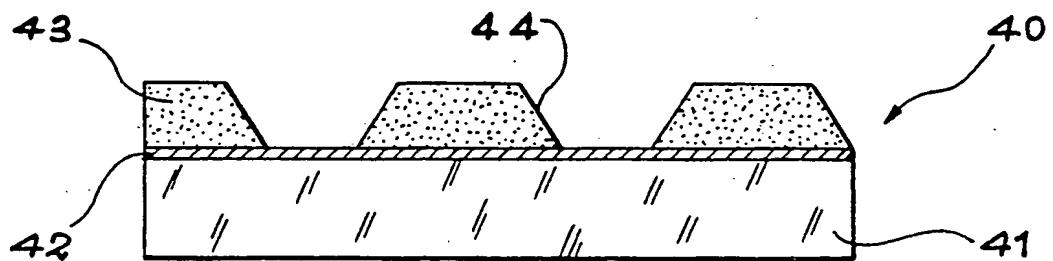


FIG. 4

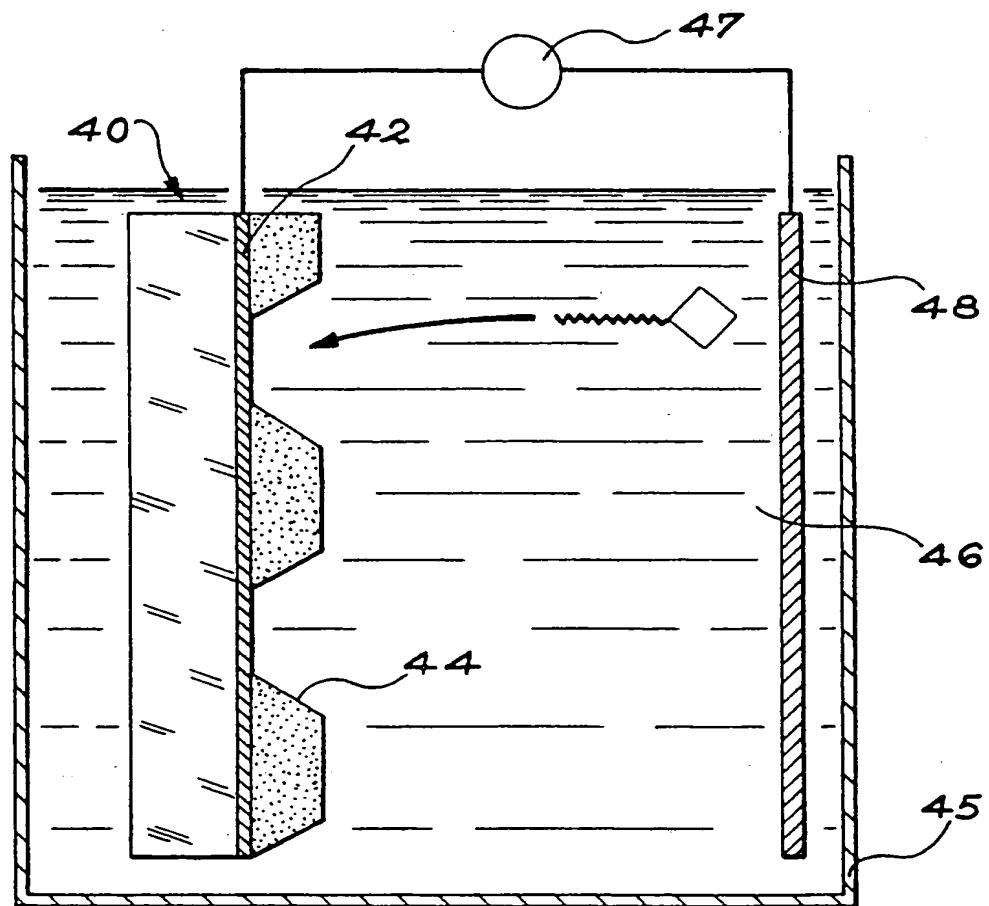


FIG. 5

4 / 5

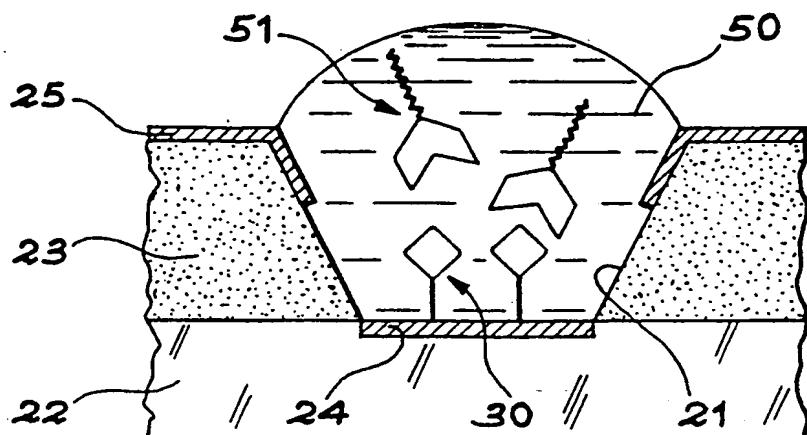


FIG. 6

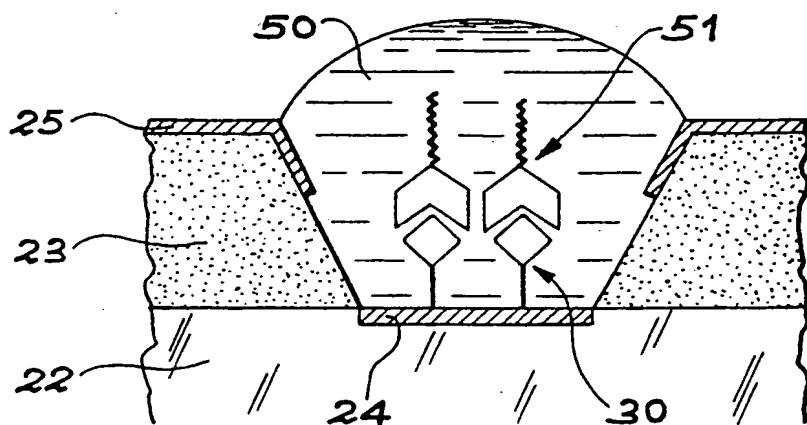


FIG. 7

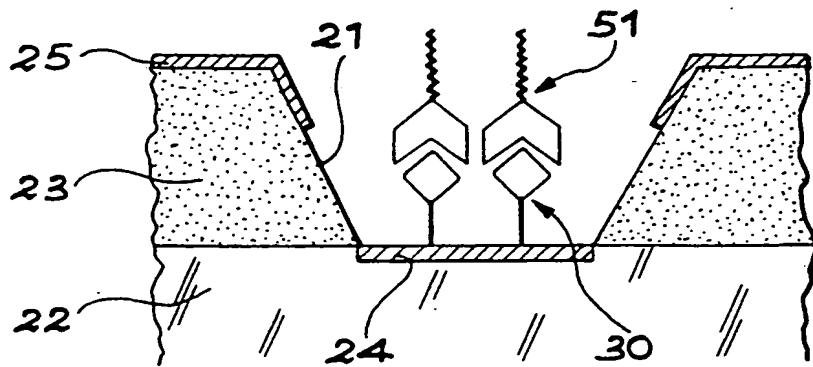


FIG. 8

5 / 5

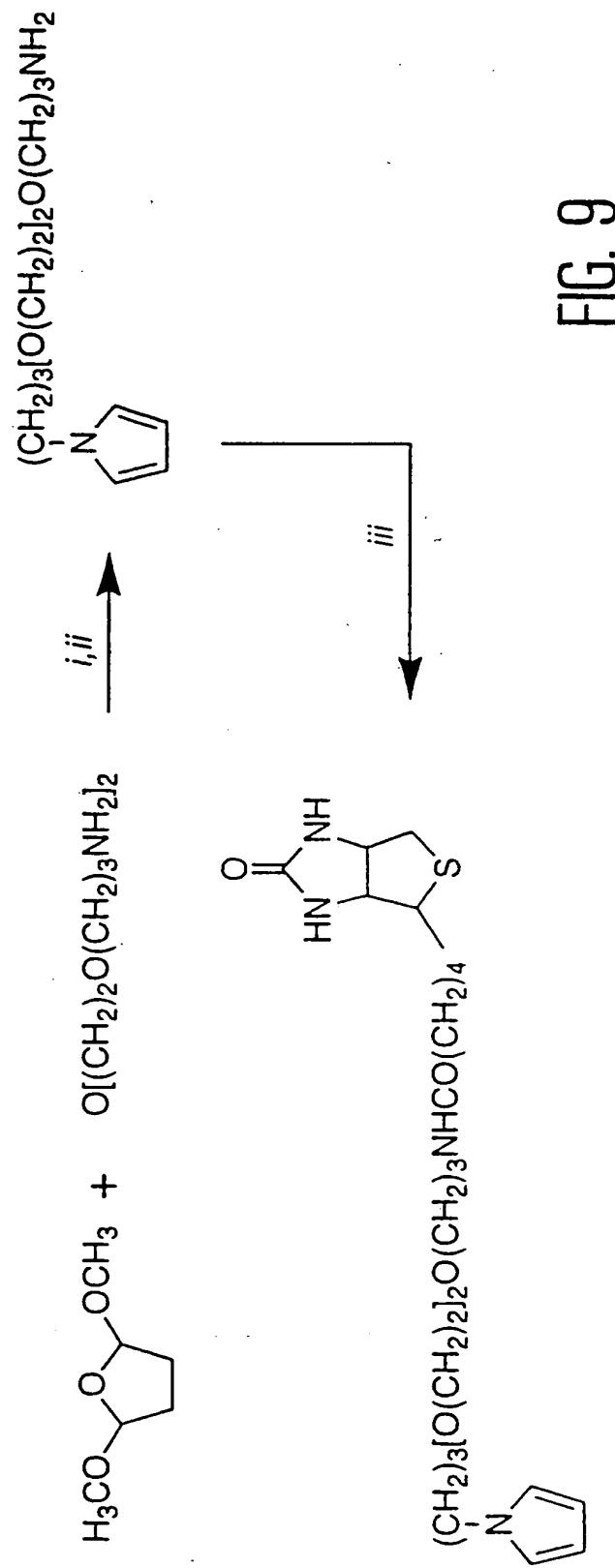


FIG. 9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02446

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 August 1997 (1997-08-05) column 4 -column 6; figure 15	1-30
Y	WO 93 06237 A (ALLAGE ASSOCIATES INC) 1 April 1993 (1993-04-01) example 3	1-30
A	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORP) 19 December 1990 (1990-12-19) the whole document	1, 18
A	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19 September 1996 (1996-09-19) examples	1, 18
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

16 December 1999

11/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

II. National Application No  
PCT/FR 99/02446

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5653939	A 05-08-1997	US 5846708 A EP 0638173 A JP 7508831 T WO 9322678 A AT 176324 T DE 69228291 D DE 69228291 T EP 0543550 A JP 5322817 A US 5532128 A US 5670322 A US 5891630 A	08-12-1998 15-02-1995 28-09-1995 11-11-1993 15-02-1999 11-03-1999 02-06-1999 26-05-1993 07-12-1993 02-07-1996 23-09-1997 06-04-1998
WO 9306237	A 01-04-1993	US 5312762 A	17-05-1994
EP 0402917	A 19-12-1990	US 5156810 A AT 145064 T CA 2019039 A DE 69029060 D DE 69029060 T JP 2874964 B JP 3128449 A US 5427915 A US 5491097 A US 5622872 A US 5571568 A US 5268305 A	20-10-1992 15-11-1996 15-12-1990 12-12-1996 30-04-1997 24-03-1999 31-05-1991 27-06-1995 13-02-1996 22-04-1997 05-11-1996 07-12-1993
WO 9628538	A 19-09-1996	AU 5420596 A BR 9607193 A CA 2213854 A CN 1186513 A CZ 9702844 A EP 0821726 A HU 9801679 A JP 11502617 T	02-10-1996 11-11-1997 19-09-1996 01-07-1998 14-10-1998 04-02-1998 28-10-1998 02-03-1999
US 5776791	A 07-07-1998	FR 2741476 A EP 0774662 A JP 9199664 A	23-05-1997 21-05-1997 31-07-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Ande Internationale No  
PCT/FR 99/02446

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, terme de recherche utilisée)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 août 1997 (1997-08-05) colonne 4 -colonne 6; figure 15	1-30
Y	WO 93 06237 A (ALLAGE ASSOCIATES INC) 1 avril 1993 (1993-04-01) exemple 3	1-30
A	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORP) 19 décembre 1990 (1990-12-19) le document en entier	1, 18
A	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19 septembre 1996 (1996-09-19) exemples	1, 18
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant porter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 décembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.national Application No  
PCT/FR 99/02446

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 776 791 A (TEOULE ROBERT ET AL) 7 July 1998 (1998-07-07) column 2 -column 4	1,18
X	COSNIER, S.: "Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors." ELECTROANALYSIS, vol. 9, no. 12, 1997, pages 894-902, XP002101569 the whole document	1,18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche internationale No  
PCT/FR 99/02446

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 5653939 A	05-08-1997	US 5846708 A EP 0638173 A JP 7508831 T WO 9322678 A AT 176324 T DE 69228291 D DE 69228291 T EP 0543550 A JP 5322817 A US 5532128 A US 5670322 A US 5891630 A		08-12-1998 15-02-1995 28-09-1995 11-11-1993 15-02-1999 11-03-1999 02-06-1999 26-05-1993 07-12-1993 02-07-1996 23-09-1997 06-04-1998
WO 9306237 A	01-04-1993	US 5312762 A		17-05-1994
EP 0402917 A	19-12-1990	US 5156810 A AT 145064 T CA 2019039 A DE 69029060 D DE 69029060 T JP 2874964 B JP 3128449 A US 5427915 A US 5491097 A US 5622872 A US 5571568 A US 5268305 A		20-10-1992 15-11-1996 15-12-1990 12-12-1996 30-04-1997 24-03-1999 31-05-1991 27-06-1995 13-02-1996 22-04-1997 05-11-1996 07-12-1993
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 5420596 A BR 9607193 A CA 2213854 A CN 1186513 A CZ 9702844 A EP 0821726 A HU 9801679 A JP 11502617 T		02-10-1996 11-11-1997 19-09-1996 01-07-1998 14-10-1998 04-02-1998 28-10-1998 02-03-1999
US 5776791 A	07-07-1998	FR 2741476 A EP 0774662 A JP 9199664 A		23-05-1997 21-05-1997 31-07-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 99/02446

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 776 791 A (TEOULE ROBERT ET AL) 7 juillet 1998 (1998-07-07) colonne 2 -colonne 4	1,18
X	COSNIER, S.: "Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors." ELECTROANALYSIS, vol. 9, no. 12, 1997, pages 894-902, XP002101569 le document en entier	1,18